

Validação do Método Analítico de Determinação de Fibra Alimentar Total para Atender a DOQ-CGRE-008 de 2011 do Inmetro

Freitas, S.C.; Conte C.; Silva, T.S.

Introdução.

Para atender às normas ABNT NBR ISO/IEC 17025 – Requisitos Gerais de Competência dos Laboratórios de Ensaio e Calibração (1), o INMETRO (2) publicou um documento (DOQ-CGRE-008 de 2011) de orientação sobre validação de métodos analíticos que foi seguido no ensaio de fibra alimentar total seguindo o protocolo, de acordo com a definição de cada área e sub-área de atividade, empregando matrizes pertencentes a cada uma das sub-áreas, conforme descrito no Documento NIT-DICLA-016 (3). Em Laboratórios de Análise de Alimentos há necessidade de se obter certificações para garantir que as características de desempenho de um método sejam entendidas e demonstradas, indicando que o mesmo é cientificamente sadio, sob as condições nas quais ele deve ser aplicado.

A aplicação deste guia demonstrou que o método de Determinação de Fibra alimentar Total pelo método 985.29, AOAC-2005 Association of Official Analytical Chemists, 18 ed., 3ª rev. 2010 (4) é capaz de atender às necessidades do problema analítico e que está validado para uma gama de matrizes.

Material e Métodos.

O material para validação do método foi selecionado de acordo com as áreas descritas na NIT-DICLA-016 (3). Matrizes usadas: camarão congelado, feijão, iogurte com fibras, biscoito e suco de maçã.

O método de determinação de fibra alimentar total seguiu a norma nº 985.29, da AOAC-2005 Association of Official Analytical Chemists, 18 ed., 3ª rev. 2010 (4). A validação seguiu a publicação do INMETRO, denominada: Elaboração de escopo de ensaios. Norma NIT-DICLA 016. Out/2011 (3). Para verificação de valores aberrantes foi realizado o teste de Grubbs, com nível de significância de 99%.

Resultados e Discussão.

1 – Validação do Branco

Dados do ensaio de repetitividade

Matriz – Resíduo do branco de análise de fibra alimentar

Replicatas	massa em g
1	0,0024
2	0,0118
3	0,0026
4	0,0034
5	0,0043
6	0,0013
7	0,0051

$$LD = \bar{X} + t_{(n-1, 1-\alpha)} \cdot s$$

$$LQ = \bar{X} + 5s$$

LD – limite de detecção

LQ – limite de quantificação

\bar{X} – média; n – total de ensaios;

s – desvio padrão;

t – valor de Student

8	0,0020
9	0,0079
10	0,0056

α – grau de confiança

Outlier: não

2 - Validação por sub-áreas de atividades

a) Dados do ensaio de repetitividade

Todos os resultados referem-se aos resíduos das respectivas análises

1 – Alimento de origem animal

2 – Lácteos

1- Matriz: camarão

Matriz: iogurte com fibras

Replicatas	massa em g
1	0,0591
2	0,0549
3	0,0585
4	0,0588
5	0,0560
6	0,0519
7	0,0564
8	0,0573
9	0,0548
10	0,0624

Replicatas	massa em g
1	0,0309
2	0,0245
3	0,0233
4	0,0289
5	0,0235
6	0,0268
7	0,0236
8	0,0252
9	0,0235
10	0,0235

Outlier: não

Outlier: não

3 – Alimentos de origem vegetal

4 – Alimentos processados

Matriz: feijão

Matriz: Biscoito

Replicatas	massa em g
1	0,1644
2	0,1613
3	0,1665
4	0,1615
5	0,1615
6	0,1632
7	0,1614
8	0,1637
9	0,1603
10	0,1571

Replicatas	massa em g
1	0,1002
2	0,1003
3	0,1039
4	0,1129
5	0,1141
6	0,1150
7	0,1152
8	0,1177
9	0,1187
10	0,1191

Outlier: não

Outlier: não

5 – Bebidas não alcoólicas

Matriz: Suco de maçã

Replicatas	massa em g
1	0,0169
2	0,0135
3	0,0175
4	0,0174
5	0,0152
6	0,0175

7	0,0177
8	0,0169
9	0,0175
10	0,0165

Outlier: não

b) Dados do ensaio de precisão intermediária

1 – Alimentos de origem animal

Matriz: camarão

Replicatas	massa em grama
1	0,0553
2	0,0566
3	0,0572

2 – Lácteos

Matriz: iogurte com fibras

Replicatas	massa em grama
1	0,0260
2	0,0234
3	0,0259

3 – Alimentos de origem vegetal

Matriz: feijão

Replicatas	massa em grama
1	0,1614
2	0,1637
3	0,1603

4 – Alimentos processados

Matriz: Biscoito

Replicatas	massa em grama
1	0,1150
2	0,1152
3	0,1177

5 – Bebidas não alcoólicas

Matriz: Suco de maçã

Replicatas	massa em grama
1	0,0169
2	0,0171
3	0,0171

3 - Resultados dos Ensaio

3.1 – LD e LQ

$$\bar{X} = 0,0046$$

$$s = 0,0032$$

t = 3,00, para 98% de confiança.

$LD = \bar{X} + t_{(n-1, 1-\alpha)} \cdot s$	$LQ = \bar{X} + 5s$
LD = 0,0147	LQ = 0,0206

O limite de quantificação foi definido de acordo com o encontrado para o resíduo de branco de análise que foi de 0,0206g, então o valor do resíduo da amostra deve ser \geq a 0,0206g.

A faixa superior de trabalho pode ser estabelecida de acordo com a máxima quantidade de fibra alimentar total encontrada em alimentos, que foi de 78,3 g/100g.

3.2 – Repetitividade

Aos dados obtidos dos resíduos de análise de 10 replicatas das 5 matrizes em estudo foi aplicado o Teste de Grubbs e os resultados não apresentaram dispersão.

Foram calculados a média, o desvio padrão e a variância dos dados obtidos, e a partir destes, foi calculado o limite de repetitividade (r).

$$r = t_{(n-1,1-\alpha)}\sqrt{2}.S$$

Onde:

t = distribuição de Student dependente do tamanho da amostra e do grau de confiança

s = desvio padrão amostral associado aos resultados considerados.

1 – Alimentos de origem animal Matriz : Camarão Média = 0,0570 Desvio padrão (S) = 0,0029 Variância (V) = 0,000 t = 2,821, para 98% de confiança. Limite de repetitividade (r) = 0,0116	2 – Lácteos Matriz : Yogurte Média = 0,0254 Desvio padrão (S) = 0,0027 Variância (V) = 0,0000 t = 2,821, para 98% de confiança. Limite de repetitividade (r) = 0,0106
3 – Alimentos de origem vegetal Matriz : Feijão Média = 0,1621 Desvio padrão (S) = 0,048 Variância (V) = 0,002 t = 2,82, para 98% de confiança. Limite de repetitividade (r) = 0,190	4 – Alimentos processados Matriz: Biscoito Média = 0,1130 Desvio padrão (S) = 0,0066 Variância (V) = 0,0000 t = 2,821, para 98% de confiança. Limite de repetitividade (r) = 0,0262
5 – Bebidas não alcoólicas Matriz : Suco de maçã Média = 0,0170 Desvio padrão (S) = 0,0008 Variância (V) = 0,0000 t = 2,821, para 98% de confiança. Limite de repetitividade (r) = 0,0031 Obs.: Os dados para esta matriz não se mostraram	

relevantes, em razão da matriz em estudo apresentar o valor de resíduo abaixo do limite quantificação (LQ)	
--	--

3.3 – Precisão intermediária

Cálculo do desvio padrão da precisão intermediária (Spi(j,k)):

$$Spi_{(j,k)} = \sqrt{\frac{1}{t(n-1)} \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - Y_j)^2}$$

Onde:

t = total de amostras ensaiadas

n = total de ensaios efetuados por amostra

j= nº da amostra, j = 1, t

k = nº do ensaio da amostra j, k=1, n

yjk = valor do resultado de k para a amostra j

Yj = representa a média aritmética dos resultados da amostra j.

1 – Alimentos de origem animal	Média: 0,0564 Desvio Padrão da precisão intermediária (Spi): 0,0010
2 – Lácteos	Média: 0,0251 Desvio Padrão da precisão intermediária (Spi): 0,0015
3 – Alimento de origem vegetal	Média: 0,1618 Desvio Padrão da precisão intermediária (Spi): 0,0017
4 – Alimentos processados	Média: 0,1160 Desvio Padrão da precisão intermediária (Spi): 0,0015
5 – Bebidas não alcoólicas	Média: 0,0172 Desvio Padrão da precisão intermediária (Spi): 0,0003

3.4 – Seletividade

O método pode ser avaliado como seletivo, pois considera todos os possíveis interferentes, como descrito no método oficial da AOAC. A matriz deve possuir no máximo 10 % de gordura, o amido é eliminado por intermédio das enzimas α-amilase e amiloglucosidase, e as proteínas são hidrolisadas pela enzima protease. No resíduo obtido são eliminados os valores de proteína residual e resíduo mineral fixo.

3.5 – Exatidão

3.5.1 - Resultados de Interlaboratoriais satisfatórios em matrizes diversas

Provedor	Matriz	Z
Cientec	Espinafre em pó	-0,7
Cientec	Feijão	0,3
Cientec	Espinafre em pó	0,3
FAPAS	Breadcrumbs	-0,3

Z – score (-2 ≤ z ≤ 2) para resultados satisfatórios

4 – Discussão dos Dados

O ensaio do branco de análise apresentou um valor médio de resíduo de 0,0046, baseado neste valor foi calculado o valor de LD (0,0147) e o LQ (0,0206), o que sugere que o limite inferior de trabalho deve apresentar o valor de resíduo $\geq 0,0206$.

O limite superior foi estabelecido a partir de ensaios realizados no laboratório, sendo então o maior valor de trabalho de 78,3g de fibra alimentar em 100g de amostra.

O limite de repetitividade do método que é apresentado no quadro abaixo mostra os valores obtidos para uma matriz pertencente a cada uma das subáreas de atividade conforme NIT-DICLA-016 (3), mostrando que as diferenças entre os resíduos das replicatas devem apresentar valor $\leq r$.

O limite de repetitividade do método apresentado no quadro abaixo, mostra os valores obtidos para uma matriz pertencente a cada uma das sub-áreas de atividade conforme a NIT-DICLA – 016 (3) e definindo que as diferenças entre as replicatas devem apresentar valor $\leq r$.

Sub-área de atividade	Matriz	$\leq r$
Alimentos de origem animal	Camarão	0,0116
Lácteos	Yogurtr	0,0106
Alimentos de origem vegetal	Feijão	0,0102
Alimentos processados	Biscoito	0,0262
Bebidas não alcoólicas	Suco de maçã	0,0031

Em relação aos dados obtidos no teste de precisão intermediária para as matrizes selecionadas, pertencentes a cada uma das sub-áreas de atividades, foram observados valores para o desvio padrão da precisão intermediária (S_{pi}) variando de 0,0003 a 0,0017, portanto a variabilidade dos resíduos de análise das matrizes analisadas pelo laboratório de físico-química devem apresentar valores de $\leq 0,0003$ a $\leq 0,0017$ de desvio padrão, de acordo com cada sub-área de atividade.

Sub-área	Matriz	$\leq S_{pi}$
Alimentos de origem animal	Camarão	0,0010
Lácteos	Yogurte com fibras	0,0015
Alimentos de origem vegetal	Feijão	0,0017
Alimentos processados	Biscoito	0,0015
Bebidas não-alcoólicas	Suco de maçã	0,0003

Conclusão

Os descritores aplicados demonstraram ser adequados para se concluir que o método de determinação de fibra alimentar total está validado para uma gama de matrizes. A aplicação dos critérios estabelecidos no documento de caráter orientativo DOQ-CGCRE-008 (2) indicou, de

acordo com os resultados obtidos, que o método de fibra alimentar total está validado para as matrizes representativas de cada sub-área de atividade conforme descrito pelo INMETRO (NIT-DICLA-016) (3).

Referências

- 1 - ABNT NBR ISO/IEC 17025: Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2005. 31 p.
- 2 - INMETRO. Orientações sobre validação de métodos analíticos: Documento de caráter orientativo: DOQ-CGCRE-008: Revisão 04-ul/2011. 2011. Disponível em: <<www.inmetro.gov.br/Sidoq/.../CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf. Acesso em: 21 ago. 2012.
- 3 - INMETRO. Elaboração de escopo de ensaios. Norma NIT-DICLA 016. Out/2011. Disponível em: www.inmetro.gov.br/Sidoq/pesquisa_link.asp?seq_tipo...4...uo... Acesso em: 02 out. 2012.
- 4 - HOROWITZ, W. (Ed.) Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL 18.ed. Gaithersburg, : AOAC INTERNATIONAL, MD USA, 2005, revisão 2010.